

## 論文内容の要旨

論文提出者氏名 内橋 基樹

### 論文題目

Cardiac-specific Bdh1 overexpression ameliorates oxidative stress and cardiac remodeling in pressure overload-induced heart failure

### 論文内容の要旨

心臓は脂肪酸及び糖を主なエネルギー源とし、心不全の進行と共に脂肪酸代謝や糖代謝が低下する事が知られている。一方、その他の代謝基質であるケトン体についての過去の報告は少なく、心不全におけるケトン体代謝については未解明な部分が多い。

ケトン体は脂肪酸の $\beta$ 酸化由来のアセチル CoA を基に肝臓で合成され、脳、心臓、筋肉などでエネルギー源として利用される。ケトン体は acetone、acetoacetate、beta-hydroxybutyrate の3つからなり、心臓では beta-hydroxybutyrate が主要な代謝基質である。Bdh1(D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase) は acetoacetate と beta-hydroxybutyrate との間の酸化還元酵素であり、心臓におけるケトン体代謝を制御する主要因子である。

TAC (Transverse Aortic Constriction)による圧負荷心不全モデルマウスを用いた網羅的遺伝子発現解析を施行した結果、野生型マウスの心臓で Bdh1 が有意に上昇していた。そこで今回我々は、心臓特異的に Bdh1 を過剰発現させた遺伝子改変マウス(Bdh1-Tg マウス)を作成し、ケトン体代謝を亢進させることで心不全の進行を防ぐことが出来るかどうかを検討する事とした。

まず、ランゲンドルフ灌流心において圧負荷心不全におけるケトン体代謝を評価した。その結果、TAC8 週後の野生型マウスにおいて有意にケトン体代謝が亢進しており、さらに TAC 後の Bdh1-Tg マウスでは TAC 後の野生型マウスに比べて有意にケトン体利用が亢進していることが確認された。この時、脂肪酸の利用は有意差は認められないものの、低下する傾向にあった。

次に、TAC 後の心機能を心エコーで経時的に評価したところ、Bdh1-Tg マウスでは野生型マウスに比べて左室収縮が有意に保たれ、左室拡大も有意に抑制された。TAC 後の心筋重量の増加は Bdh1-Tg マウスでは野生型マウスに比べて有意差は認められないものの抑制される傾向にあり、TAC 後の肺重量は Bdh1-Tg マウスでは野生型マウスに比べて有意に抑制されていた。mRNA による定量 PCR では、BNP 及び線維化促進に関連する遺伝子発現

について、TAC 後の増加が Bdh1-Tg マウスで有意に抑制されていた。以上の結果から、心不全期にはケトン体利用が亢進し、心機能低下の抑制に関与しているものと考えられた。

また、High-performance liquid chromatography (HPLC)を用いて TAC8 週後における高エネルギーリン酸代謝の評価を行った。Bdh1-Tg マウスでは野生型マウスに比べて、心臓での ATP 及び Phosphocreatine レベルの低下がやや改善するものの有意差を認めなかった。ケトン体代謝の亢進がエネルギー不足に対する充足に寄与するものの、全体に占める割合は比較的少なく、統計学的有意差には至らないものと考えられた。

ケトン体はその抗酸化作用が近年注目されていることから、Bdh1-Tg マウスにおける抗酸化効果について検討した。心臓における蛋白のカルボニル化の評価を行うと TAC の前後で増加する蛋白カルボニル化は野生型マウスに比べて Bdh1-Tg マウスで有意に抑制されていた。組織学的な検討でも圧負荷心不全における 8-OHdG(8-hydroxy-2'-deoxyguanosine)陽性細胞数は野生型マウスに比べて Bdh1-Tg マウスで有意に抑制されていた。*in vitro* study では、ラット心筋芽細胞(H9c2細胞)において Rotenoneに誘導される ROS(Reactive oxygen species)を標識し Flow cytometry で測定した。アデノウイルスベクターを用いて Bdh1 を過剰発現させると、beta-hydroxybutyrate の存在下で有意に ROS の産生が低下した。

また、TAC を行うと血中のケトン体濃度は有意差はないものの低下する傾向にあり、心臓組織中のケトン体濃度においては Bdh1-Tg マウスで有意に上昇していた。mRNA による定量 PCR で抗酸化遺伝子の発現を評価したところ、TAC 後の Bdh1-Tg マウスでは SOD が有意に上昇していた。

さらに、浸透圧ポンプを用いて beta-hydroxybutyrate の持続的腹腔内投与を行い、心臓での抗酸化遺伝子の発現を検討した。Bdh1-Tg マウスで、MT2、Catalase、Foxo3a の発現が上昇し、*in vitro* でも Bdh1 を過剰発現させた H9c2 細胞において beta-hydroxybutyrate の存在下で抗酸化遺伝子の発現が上昇していた。

また、beta-hydroxybutyrate を投与後のマウス心臓でのヒストンアセチル化の評価を行ったところ Bdh1-Tg マウスは野生型マウスに比べて H3K27 のアセチル化が有意に増加している事が分かった。

以上の結果より、心不全期にエネルギー基質としてのケトン体利用が亢進する事で抗酸化効果が認められ、これが心臓リモデリングの抑制や心機能低下の抑制に寄与していると考えられた。心不全においてケトン体代謝を制御することは新たな治療手段になり得ると考えられる。